

晚期糖基化终产物对心肌成纤维细胞的老化及纤维化的影响

方 敏¹,李世玲¹,王俊宏¹,郭 妍^{1,2*}

(¹南京医科大学第一附属医院老年心血管科,江苏 南京 210029;²江苏盛泽医院心血管科,江苏 苏州 215228)

[摘要] 目的:探讨晚期糖基化终产物(AGEs)诱导心肌成纤维细胞老化及纤维化的相关机制。方法:用 AGEs(200 μg/ml)及抗 RAGE 抗体(2 μg/ml)、TGF-β1/smad 通路抑制剂(SB431542, 10 μmol/L)干预乳鼠心肌成纤维细胞 72 h。观察老化相关指标 β-半乳糖苷酶的活性及 p16 的表达;Western blot 检测 TGF-β1、p-smad2/3、MMP-2 的水平。结果:AGEs 干预 72 h 后,AGEs 组细胞老化指标 β-半乳糖苷酶的活性及 p16 的表达水平较对照组明显升高($P < 0.01$),伴有 TGF-β1、p-smad2/3、MMP-2 水平的显著增高,而给予抗 RAGE 抗体或 SB431542 干预后,β-半乳糖苷酶的活性及 p16 的表达水平较 AGEs 组明显下降,同时 TGF-β1、p-smad2/3、MMP-2 的水平也显著下降。结论:推测 AGEs 可与其受体 RAGE 作用诱导心肌成纤维细胞的老化,而 TGF-β1/smad 信号通路引发的心肌纤维化可能参与了这一过程。

[关键词] AGEs;RAGE;TGF-β/smad;心肌老化;心肌纤维化

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)01-022-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140105

Aging and fibrosis effects of advanced glycation end products on cardiac fibroblasts

Fang Min¹, Li Shiling¹, Wang Junhong¹, Guo Yan^{1,2*}

(¹Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Cardioangiopathy, Shengze Hospital of Jiangsu Province, Suzhou 215228, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms of cardiac fibroblasts aging and fibrosis induced by advanced glycosylation end-products (AGEs). **Methods:** Neonatal rat cardiac fibroblasts were incubated for 72h with AGEs (200 μg/ml), anti-RAGE antibody (2 μg/ml) and TGFβ/smad signaling pathway inhibitor (SB431542, 10 μmol/L). Senescence-associated beta galactosidase activity and p16 expression were observed; MMP-2, TGF-β1 and p-smad2/3 were measured by Western blot. **Results:** After intervened with AGEs for 72 h, senescence-associated beta galactosidase activity and the level of p16 in the AGEs group were significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$), accompanied with significant increases of the expressions of TGF-β1, p-smad2/3 and MMP-2. However, senescence-associated beta galactosidase activity and the expression of p16 were remarkably down-regulated after the pretreatment of anti-RAGE antibody and SB431542 compared with those of the AGEs group, meanwhile, the levels of TGF-β1, p-smad2/3 and MMP-2 were also significantly decreased. **Conclusion:** We conclude that AGEs could induce cardiac fibroblasts aging through binding to its receptor RAGE, and cardiac fibrosis induced by TGF-β/smad pathway could be involved in this process.

[Key words] AGEs; RAGE; TGF-β/smad; cardiac aging; cardiac fibrosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):022-026]

晚期糖基化终产物(AGEs),是以蛋白质、脂肪及核酸的氨基及还原糖(葡萄糖、果糖、戊糖等)为原料,在生理环境中发生非酶催化反应(Maillard反

应)生成的稳定共价化合物,随着年龄的增加,在体内含量增加^[1],糖尿病加速此过程。本课题组既往研究发现 AGEs 与心肌老化及舒张功能障碍密切相关^[2];同时其他学者也发现 AGEs 与纤维化相关^[3],但 AGEs 在心肌成纤维细胞老化及心肌纤维化过程中的具体作用及机制目前尚不明确。因此,本文着重于研究 AGEs 诱导心肌成纤维细胞老化及纤维化的潜在机制。

[基金项目] 江苏省科技厅自然科学基金(BK2011382),江苏省“六大人才高峰”(2011WSN-029),江苏省卫生厅科技项目(Z201301)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoyan51@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料

Sprague-Dawley (SD) 乳大鼠, 1~3 日龄(南京医科大学实验动物中心)。DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司; II 型胶原酶购自美国 BIOSHARP 公司; AGEs 购自美国 Calbiochem 公司 (121800); 抗 RAGE 抗体购自美国 R&D 公司 (AF1616); SB431542 购自美国 Gene Operation 公司 (ITB1001-0050MG); β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自海门碧云天; p16 购自美国 Santa Cruz 公司; TGF- β 1、MMP-2 抗体购自美国 Epitomics 公司; smad2/3、p-smad2/3 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 心肌成纤维细胞的提取及培养

SD 乳大鼠心肌成纤维细胞的提取及培养, 参照文献提供方法^[7], 并加以改进。无菌条件下, 取 1~3 d SD 乳大鼠于 75% 酒精中消毒, 开胸取心脏, 在预冷的 PBS 中去除血液及大血管、心房组织, PBS 洗 3 遍, 剪碎, 加入 0.1% II 型胶原酶于 37℃、200 r/min 恒温摇床消化 20 min, 每隔 3~5 min 收集上清液, 直至消化完全, 加入 1~2 ml 胎牛血清终止消化。过滤上清液, 于 4℃、1 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 吹匀, 接种于 10 cm 平皿, 于 5% CO₂ 孵箱静置 2 h 后, 弃悬浮液, 贴壁的为心肌成纤维细胞。

1.2.2 实验分组及干预

本实验采用第 3 代细胞, 经无血清 DMEM 高糖培养基饥饿 24 h 后进行干预。分为 4 组, 正常对照组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 未予以任何干预; AGEs 组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 予以 200 μ g/ml AGEs; AGEs+抗 RAGE 抗体 (具有中和作用的抗体) 组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 2 μ g/ml 抗 RAGE 抗体作用 2 h 后^[5], 予以 200 μ g/ml AGEs; AGEs+SB431542 组: 正常培养的心肌成纤维细胞, 10 μ mol/L SB431542 作用 2 h 后^[6], 培养液中加以 200 μ g/ml AGEs。各组细胞均干预 72 h。

1.2.3 Western blot 检测心肌老化及纤维化相关蛋白

收集细胞后加入细胞裂解液, 离心 (4℃, 12 000 r/min, 20 min), 取上清弃沉淀。BCA 法测定蛋白浓度, 并加入相应 Loading Buffer。等量蛋白 30 μ g/孔, 通过 SDS-PAGE 分离, 电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗, 4℃ 过夜, 二抗 (兔抗) 作用 2 h。显色液为 ECL 化学发光试剂, 检测目的蛋白。

Alpha Ease FC 及 GraphPad Prism 5.0 软件分析目的蛋白条带灰度值, 并与内参 GAPDH 相比, 测定目的蛋白的表达水平, 每组细胞重复测定 3 次, 计算其均值及标准差。

1.2.4 β -半乳糖苷酶染色

根据试剂盒说明书步骤, 并参照有关文献所述方法^[4], 在 pH6.0 时检测 β -半乳糖苷酶的活性。将第 3 代 SD 乳大鼠心肌成纤维细胞均匀铺入 6 孔板, 加药干预 72 h, 吸弃培养基, PBS 洗涤, 1 ml β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15 min; 吸弃固定液, PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min; 每孔加入染色工作液 (包括 X-Gal 溶液) 1 ml; 37℃ 孵育过夜; 普通光学显微镜下 (100 倍), 计数胞质蓝染细胞数, 每个视野计数至少 100 个细胞, 每组取 5 个视野, 计算细胞染色阳性率, 染色阳性率 (%) = 染色阳性细胞数 / 总细胞数 \times 100%。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS13.0 软件分析处理, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法。P \leq 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AGEs 对心肌成纤维细胞老化的影响

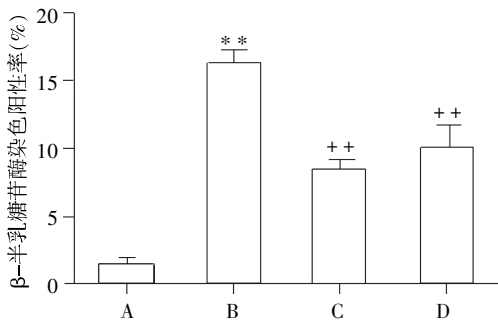
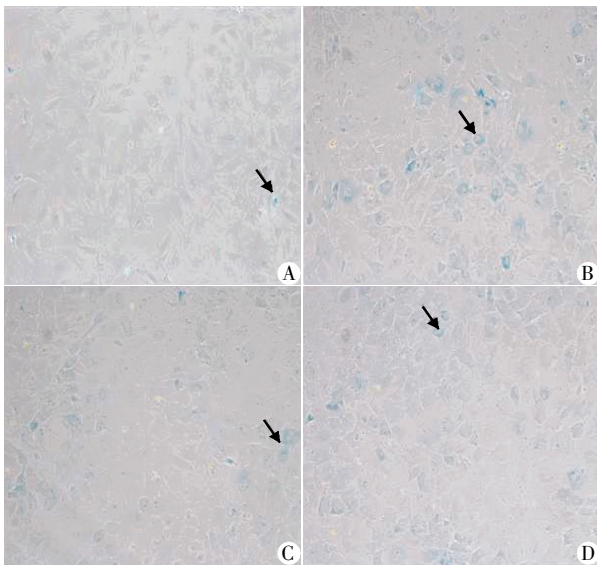
与正常对照组相比, AGEs 组 β -半乳糖苷酶染色阳性率显著增加 (正常组: 1.6% \pm 0.9%, AGEs 组: 16.4% \pm 1.5%, P < 0.01); p16 的表达量较对照组明显升高 1.6 倍 (P < 0.01); 而抗 RAGE 抗体及 SB431542 预处理后, β -半乳糖苷酶染色阳性率分别为 8.6% \pm 1.3% 和 1.2% \pm 0.7%, 较 AGEs 干预组显著降低 (P < 0.01, 图 1); p16 的表达较 AGEs 组分别降低 1.7 倍、2.1 倍 (P < 0.01, 图 2)。

2.2 AGE-RAGE 轴对乳鼠心肌成纤维细胞 MMP-2 表达的影响

与正常对照组相比, AGEs 组 MMP-2 的表达量显著增加 2.1 倍 (P < 0.05), 而抗 RAGE 抗体及 SB431542 预处理后, MMP-2 的表达较 AGEs 组分别减少 2.3 倍、2.5 倍 (P < 0.01, 图 3)。

2.3 AGEs 对 TGF- β 1 smad 信号通路的影响

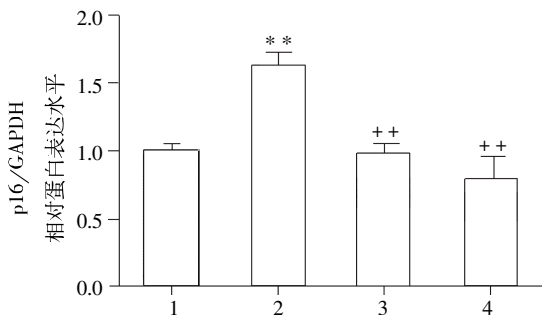
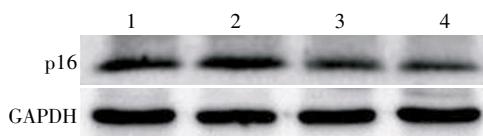
与正常对照组相比, AGEs 组 TGF- β 1 上调 1.5 倍 (P < 0.05)、p-smad2/3 上调 1.6 倍 (P < 0.01), 抗 RAGE 抗体及 SB431542 预处理后, TGF- β 1 的表达分别较 AGEs 组下调 1.8 倍、1.6 倍 (P < 0.05), p-smad2/3 分别下调 1.4 倍、2.0 倍 (P < 0.01, 图 4)。



A: 对照组;B:200 μg/ml AGEs 干预 72 h;C:2 μg/ml 抗 RAGE 抗体+200 μg/ml AGEs 干预 72 h;D:10 μmol/L SB431542+200 μg/ml AGEs 干预 72 h。图中箭头所指的蓝染细胞,为 β-半乳糖苷酶染色阳性细胞。与对照组比较,***P* < 0.01;与 AGEs 组比较,++*P* < 0.01。

图 1 β-半乳糖苷酶染色

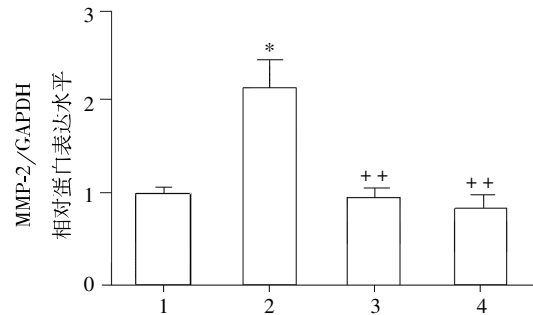
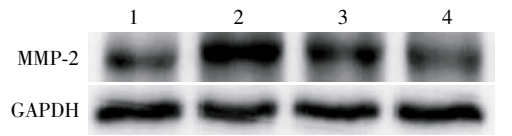
Figure 1 β-galactosidase staining



1: 对照组;2:200 μg/ml AGEs 干预 72 h;3:2 μg/ml 抗 RAGE 抗体+200 μg/ml AGEs 干预 72 h;4:10 μmol/L SB431542+200 μg/ml AGEs 干预 72 h。与 1 组比较,***P* < 0.01;与 2 组比较,++*P* < 0.01。

图 2 Western blot 检测乳鼠心肌成纤维细胞中 p16 的表达情况

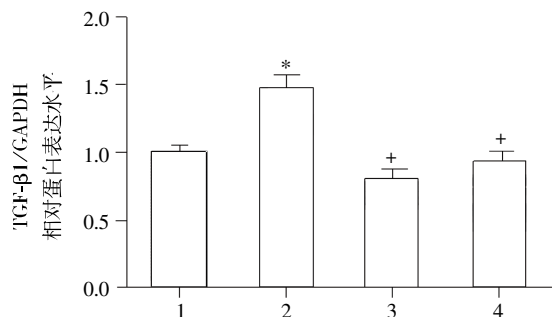
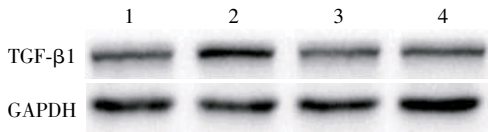
Figure 2 The expression of p16 in neonatal cardiac fibroblasts by Western blot



1: 对照组;2:200 μg/ml AGEs 干预 72 h;3:2 μg/ml 抗 RAGE 抗体+200 μg/ml AGEs 干预 72 h;4:10 μmol/L SB431542+200 μg/ml AGEs 干预 72 h。与 1 组比较,**P* < 0.05;与 2 组比较,++*P* < 0.01。

图 3 AGE-RAGE 轴对乳鼠心肌成纤维细胞中 MMP-2 表达的影响

Figure 3 Effects of AGE-RAGE axis on MMP-2 expression in neonatal cardiac fibroblasts



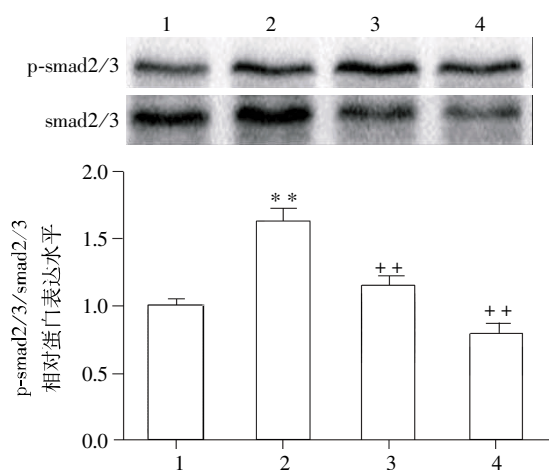
1: 对照组;2:200 μg/ml AGEs 干预 72 h;3:2 μg/ml 抗 RAGE 抗体+200 μg/ml AGEs 干预 72 h;4:10 μmol/L SB431542+200 μg/ml AGEs 干预 72 h。与 1 组比较,**P* < 0.05;与 2 组比较,+*P* < 0.05。

图 4 Western blot 检测乳鼠心肌成纤维细胞中 TGF-β1 水平

Figure 4 The level of TGF-β1 in neonatal cardiac fibroblasts by Western blot

3 讨论

大分子末端的还原性氨基与葡萄糖等还原糖分子中的醛基形成可逆的 Schiff 碱,在发生 Amadori 重排后,经过一系列脱水重排反应,最终形成 AGEs。AGEs 不仅可以与相邻蛋白上游离的氨基以共价键结合形成交联结构直接影响细胞和组织的功能,参与疾病的发生;同时,也可以与细胞表面特异性受体 RAGE 结合形成 AGE-RAGE,从而激活细胞



1: 对照组;2:200 μg/ml AGEs 干预 72 h;3:2 μg/ml 抗 RAGE 抗体+200 μg/ml AGEs 干预 72 h;4:10 μmol/L SB431542+200 μg/ml AGEs 干预 72 h。与 1 组比较, ** $P < 0.01$; 与 2 组比较, ** $P < 0.01$ 。
图 5 Western blot 检测乳鼠心肌成纤维细胞中 TGF-β1 水平
Figure 5 The level of smad in neonatal cardiac fibroblasts by Western blot

内多种信号级联反应,上调细胞内相关指标的表达,导致机体的病理变化,介导疾病的发生^[5,7-9],此外,大量实验表明,AGEs 与老化的发生发展更是密切相关^[8]。

老化的过程与 p16 显著相关,大多数老化的细胞都可表达蛋白 p16^[10-12],它是位于细胞核内的一种细胞分裂周期关键酶——CDK4 的抑制因子。而老化细胞在体外识别的一个重要标志是老化相关的 β-半乳糖苷酶(溶酶体活性增加的一个标志物)^[9]。本研究通过测定乳鼠心肌成纤维细胞 p16 蛋白的表达及 β-半乳糖苷酶活性,发现 AGEs 可上调乳鼠心肌成纤维细胞 p16 蛋白的含量,并促使 β-半乳糖苷酶活性增高,表明 AGEs 可加速心肌成纤维细胞老化过程。由于 RAGE 是 AGEs 的天然受体,是 AGEs 发挥其生物学作用的一个重要中间环节,本研究采用具有中和活性的抗 RAGE 抗体来研究 AGEs 促进心肌成纤维细胞老化是否通过 RAGE 起作用。结果发现抗 RAGE 抗体干预 72 h 后,心肌成纤维细胞的 p16 表达量较 AGEs 组明显降低,同样 β-半乳糖苷酶的活性也较 AGEs 明显下降,表明 AGEs 主要是通过细胞表面的 RAGE 相结合,激活胞内信号通路进而引发心肌老化,但目前具体的作用机制还不甚明了。

心肌老化主要表现为心肌纤维化^[4],既往研究发现在 AGEs 诱导的心肌老化过程中,心脏 AGE 修饰的胶原积聚,交联增加,左室重量与体重比率增加,连接组织生长因子(CTGF)基因和蛋白表达增

加,上述情况可以被 AGE 阻滞剂 ALT-711 改善;同时电镜下可观察到心肌结构间质增生,线粒体不规则,闰盘模糊^[2,7],表明 AGEs 诱导的心肌老化过程中伴随着纤维化的发生。然而,AGEs 诱导的心肌老化过程中纤维化的具体机制如何仍需进一步研究。

心肌成纤维细胞与心肌纤维化密切相关,心肌成纤维细胞是心肌层非心肌细胞的主要成分,而它可以通过产生细胞外基质(ECM)如胶原蛋白、基质金属蛋白酶(MMPs)等在维持心脏结构功能中发挥重要作用^[4]。调节 ECM 代谢的细胞因子中,与 ECM 积聚关系最为密切、研究最多的是转化生长因子-β(TGF-β)^[13],而 smad 蛋白家族是介导 TGF-β 信号的主要因子,TGF-β1 与其受体(如 TβRI)结合,激活 smad 蛋白(主要是 smad2/3),促使其磷酸化,将信号从细胞表面转导至细胞核,引发 ECM 的形成,参与纤维化的发生过程^[14-18]。然而,在 AGEs 诱导的心肌成纤维细胞老化的过程中,TGF-β/sm2/3 信号通路的作用如何却未见报道。本研究发现 AGEs 不仅上调了乳鼠心肌成纤维细胞 TGF-β1 及 p-smad2/3 的水平,还增加了 MMP-2 的表达量,而 SB431542(通过与通路下游 TβRI 结合后,阻断活化的 TGF-β/sm2/3 信号通路)干预后,细胞内 MMP-2、TGF-β1 及 p-smad2/3 的表达量较 AGEs 组也明显减少,提示 AGEs 诱导的心肌成纤维细胞老化过程中,或许伴随着 TGF-β/sm2/3 信号通路诱导的心肌纤维化的发生。

综上所述,AGEs 可与心肌成纤维细胞表面的 RAGE 结合,诱导细胞老化,而这一过程或许伴随着 TGF-β/sm2/3 信号通路引发心肌纤维化的发生。这些结果表明,AGEs 及其下游的信号通路可能为临床预防和治疗老年人群中糖尿病并发症、心血管疾病、肾脏病等提供一个新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Takahashi M, Oikawa M, Nagano A. Effect of age and menopause on serum concentrations of pentosidine, an advanced glycation end product [J]. J Gerontol A Biol Med Sci, 2000, 55(3): M137-140
- [2] Guo Y, Lu M, Qian J, et al. Alagebrium chloride protects the heart against oxidative stress in aging rats [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009, 64(6): 629-635
- [3] Sun YM, Su Y, Li J, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(4): 359-361
- [4] Jazbutyte V, Fiedler J, Kneitz S, et al. MicroRNA-22 in-

- creases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart[J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35(3):747-762
- [5] Zhang X, Song Y, Han X, et al. Liquiritin attenuates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction via RAGE/NF- κ B pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 374(1-2):191-201
- [6] Xu H, Zhang X, Wang H, et al. Continuous cyclic mechanical tension increases ank expression in endplate chondrocytes through the TGF- β 1 and p38 pathway[J]. *Eur J Histochem*, 2013, 57(3):e28
- [7] Liu J, Wang J, Chen X, et al. Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rat[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012:418748
- [8] Neves D. Advanced glycation end-products: a common pathway in diabetes and age-related erectile dysfunction [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(Suppl):49-69
- [9] Penfield JD, Anderson M, Lutzke L, et al. The role of cellular senescence in the gastrointestinal mucosa [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(3):270-277
- [10] Wang Y, Zang X, Chen P. High expression of p16INK4a and low expression of Bmi1 are associated with endothelial cellular senescence in the human cornea [J]. *Mol Vis*, 2012, 18:803-815
- [11] Bazarov AV, Van Sluis M, Hines WC, et al. p16(INK4a)-mediated suppression of telomerase in normal and malignant human breast cells [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(5):736-746
- [12] Coppé JP, Rodier F, Patil CK, et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42):36396-36403
- [13] Schuppan D, Koda M, Bauer M, et al. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2000, 63(4):366-370
- [14] Dai Y, Khaidakov M, Wang X, et al. MicroRNAs involved in the regulation of postischemic cardiac fibrosis[J]. *Hypertension*, 2013, 61(4):751-756
- [15] Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins[J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10(6):543-559
- [16] Malhotra N, Kang J. SMAD regulatory networks construct a balanced immune system [J]. *Immunology*, 2013, 139(1):1-10
- [17] Massagué J. TGF β signalling in context[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10):616-630
- [18] Small EM. The actin-MRTF-SRF gene regulatory axis and myofibroblast differentiation[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, 5(6):794-804
- [19] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1):137-188

[收稿日期] 2013-06-27

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>